

血清和血浆对甲醛诱导性细胞内 DPC 形成的促进作用

王昆[#], 曹毅[#], 胡均猜, 乔永康, 杨旭^{*}

华中师范大学生命科学学院 环境科学实验室, 武汉 430079

摘要: 为了探讨胎牛血清和血浆对甲醛诱导性细胞内 DNA-蛋白质交联的影响, 以昆明纯系小鼠直接分离肝细胞为试验材料进行体外染毒实验, 采用 KCl-SDS 沉淀法检测甲醛染毒后肝细胞中 DNA-蛋白质交联含量。结果表明, 当缺乏胎牛血清和血浆时, $500 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甲醛仅引起较低水平的交联效应, 而加入胎牛血清和血浆以后, 甲醛诱导的 DPC 极显著上升 ($p < 0.01$)。血浆作用比胎牛血清更明显, 但二者无显著性差异。结果提示, 胎牛血清和血浆对甲醛诱导性 DPC 形成具有促进作用, 而不是以前学者认为的缓冲作用, 这可能是甲醛远距离毒性的基础。

关键词: 甲醛; DNA-蛋白质交联; 远距离毒性

文章编号: 1673-5897(2006)2-150-05

中图分类号: X174

文献标识码: A

Promotion of Fetal Serum and Plasma on Formaldehyde Induced DNA-Protein Crosslink in Cells

WANG Kun[#], CAO Yi[#], HU Jun-cai, QIAO Yong-kang, YANG Xu^{*}

Laboratory of Environmental Science, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079

Received 13 March 2006

received in revised form 17 May 2006

accepted 18 May 2006

Abstract: In order to explore the effects of fetal serum and plasma on formaldehyde induced DNA-protein crosslink (DPC) in cells, KCl-SDS assay was applied to determine the amount of DPC in liver cells isolated from purebred Kunming mice. Results showed that formaldehyde as $500 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ induced relatively low amount of DPC at the absence of fetal serum and plasma. But DPC formation was significantly elevated in the presence of fetal serum and plasma ($p < 0.01$). Effects of plasma were somewhat more obvious, however, with no significant difference. These results indicate that fetal serum and plasma have stimulative effects, instead of buffer effects, on formaldehyde induced DPC formation. Such stimulative effects may be important mechanism for the site-distant toxicity of inhaled formaldehyde.

Keywords: formaldehyde; DNA-protein crosslink (DPC); site-distant toxicity

收稿日期: 2006-03-13 修回日期: 2006-05-17 录用日期: 2006-05-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 30570799); 湖北省科技攻关计划项目 (No. 2005AA307B01)

作者简介: [#] 并列第一作者。王昆 (1986—), 女, 理学学士; 曹毅 (1986—), 男, 理学学士; ^{*} 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn

2004 年, 世界卫生组织下属机构——国际癌症研究中心(IARC)领导的工作小组评估了甲醛致癌效应的相关报告后, 将甲醛确定为 1A 类物质(人类致癌物), 甲醛被认为与鼻咽癌、鼻窦癌等癌症有关(International Agency for Research on Cancer, 2004)。但吸入甲醛是否具有远距离毒性, 从而诱发白血病等癌症还存在较大争议。尽管流行病学调查和试验证据均表明, 吸入甲醛可能对远距离组织产生毒性效应, 并与白血病等癌症的发生紧密相关(Coggon et al., 2003; Hauptmann et al., 2003; Shaham et al., 1996; 2003), 但甲醛代谢与吸收的相关研究却表明, 吸入甲醛可在接触组织迅速积累、降解或者形成其他物质, 使自由甲醛的浓度迅速降低, 因而不可能引发远距离毒性(Collins et al., 2001; Heck et al., 2004; Franks, 2005)。由于两方面均有较充分的证据, 我们认为甲醛远距离毒性具有特殊的发生机制。

本研究组最近的研究表明, 吸入甲醛可以诱导整体动物远距离组织 DPC 的形成(Peng et al., Zhao et al., unpublished data)。根据 Heck 和 Casanova 的研究, 这种结果不可能出现, 因为机体内存在一个广泛的甲醛解毒酶系, 其活动可以降低甲醛(Heck et al., 2004)。同时, 由于甲醛化学性质活泼, 能与体内小分子反应, 从而降低自由甲醛的浓度。早期的研究表明, 吸入甲醛甚至不影响血液中自由甲醛的平衡, 说明血液对自由甲醛具有“缓冲”作用(Heck et al., 2004)。但我们注意到, 甲醛也是一种内源性化合物, 机体内存在一个广泛的内源性甲醛产生系统。这些酶包括丝氨酸羟甲基转移酶(serine hydroxymethyltransferase, SHMT)、甲基氨基酸脱氢酶(包括二甲基氨基酸脱氢酶和肌氨酸脱氢酶等)、甲基氨基酸氧化酶(例如肌氨酸氧化酶)和胺氧化酶等(Agrawal et al., 2003; Binzak et al., 2000; Reuber et al., 1997; Shi et al., 2004)。其中, 胺氧化酶的活动还与甲醛引起的蛋白质交联有关(Haberle et al., 2004)。这就存在一种可能性, 即吸入甲醛在机体内以一种中间形式运输, 在远距离组织重新释放产生甲醛, 产生远距离毒性。Thrasher 也认为, 血液中甲醛的平衡并不能说明甲醛没有远距离毒性, 吸入甲醛在血液中形成的加合物可能在远距离毒性中起重要作用, 这些加合物有可能成为次级甲醛产生者, 并诱导肿瘤的形成(Thrasher, 2001)。

本试验研究了血清和血浆对小鼠肝细胞 DPC 形成的影响。如果甲醛和小分子的反应确实可以降低游离甲醛的含量, 从而减小甲醛的毒性, 那么加入血清和血浆以后 DPC 的形成将降低; 否则, DPC 的形成将不受血清和血浆的影响, 甚至还会有上升。

1 材料与方法 Materials and methods

1.1 仪器与主要试剂

试剂: 10%的福尔马林溶液(Sigma 公司), 十二烷基硫酸钠(Merk 公司), 蛋白酶 K(Merk 公司), Hoechst33258 荧光染料(Sigma 公司), 小牛胸腺 DNA(Sigma 公司), 胎牛血清(杭州四季青公司), 其他试剂如 KCl、 NaH_2PO_4 、EDTA 均为国产。

仪器: 三用电热恒温水箱 北京长源试验仪器厂), 涡旋器, 低温冷冻离心机(Eppendorf-5415R), F-4500 型荧光分光光度计(日本日立)。

1.2 试验方法和材料

试验动物与处理 试验所用材料为湖北省预防医学院试验动物中心提供的 SPF 级昆明纯系雄性小鼠, 体重 18~20g。小鼠以摘眼球方式取血并处死, 将约 0.8mL 小鼠新鲜血液收集到 1.5mL EP 管中, EP 管中预先放置 40 μL 0.5M EDTA 作为抗凝剂, 新鲜血液在 5000 $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5min, 上层淡黄色血浆(约 0.4mL)取出以供下一步试验。取血过程中应注意避免机械损伤, 以免红细胞破碎。如果血浆呈红色, 则表明有溶血发生, 不用于下一步试验, 以避免红细胞中甲醛解毒酶系对甲醛的降解作用(正常情况下, 甲醛解毒酶系只存在于细胞中, 不存在于血浆中)。

肝细胞悬液的制备 以上小鼠处死以后迅速取出肝脏, 用生理盐水洗去表明血迹, 再用眼科剪剪成糜状(约 1 mm^3 的组织块), 4 层纱布过滤, 将细胞悬液在 1500 $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5min, 去掉上清, 细胞成分以 8mL 生理盐水重悬, 苔盼蓝排斥试验表明, 细胞存活率大于 95%, 得到的肝细胞悬液待用。

液态甲醛致分离肝细胞 DPC 的形成与培养基条件的影响 先将肝细胞吹打均匀, 向每个 1.5 mL EP 管中加入 0.5mL 细胞悬液, 1500 $\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 5min, 去上清, 加入终浓度为 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲醛(以生理盐水配制), 并根据试验要求加入生理

盐水, 10%的胎牛血清或者 10%的分离血浆 均使用生理盐水配制), 细胞吹打均匀. 37 水浴中温育 60min, 苔盼蓝排斥法证实细胞染毒后存活率在 95%以上. 染毒后, 细胞在 $1500g \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 5min, 并以生理盐水洗 2 次以去除染毒液中残留的甲醛 ($1500g \cdot \text{min}^{-1}$, 5min), 细胞成分用于 DPC 的检测. 试验独立重复 3 次, 同时进行统计分析以得到平均趋势.

1.3 DPC 的检测

DPC 的检测采用 KCl-SDS 沉淀法 (Liu et al., 2006; Zhitkovich et al., 1992; Kuykendall et al., 1995; Chakrabarti et al., 1999). 首先加入 SDS, SDS 可与 DPC 中的蛋白和细胞内蛋白结合, 而不与自由 DNA 结合; 向样品中加入 KCl 溶液, 可以使 DPC 和蛋白沉淀下来, 而自由 DNA 留在上清中. 将上清液转移, 再向沉淀中加入蛋白酶 K 消化蛋白质, 使 DPC 中 DNA 游离出来, 用荧光法同时测定此溶液中 DNA 含量 A 和原液中 DNA 含量 B, 计算 DPC 系数 η , 以此值表示 DNA 和蛋白质的交联程度, 具体计算公式如下:

$$\eta = A / (A + B) \quad (1)$$

具体步骤如下:

细胞裂解: 在染毒后的细胞沉淀中分别加入 0.5mL 2%的 SDS 溶液并轻微振荡, 然后在 65 加热 10min 裂解细胞.

游离 DNA 的分离: 从水浴取出裂解好的细胞, 加入 $100\mu\text{L}$ 溶于 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl 的 $1.0\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl (pH = 7.5), 将混合液 6 次穿过 1mL 的聚丙烯枪头, 从而使 DNA 长度统一. 混合液冰上冷冻 5min, 形成 SDS-K⁺沉淀后, 于 $10000g \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 下离心 5min 收集沉淀, 将上清液转入另一 5mL 离心管中. 沉淀加入 1mL 清洗缓冲液 ($0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, $0.1\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH = 7.5) 重悬, 65 水浴加热 10min, 冰上骤冷 5min, 重复离心和清洗步骤 3 次, 每次都得上清液转入 5mL 离心管中.

DPC 中结合 DNA 的分离: 最终的沉淀重悬于 0.5mL 的清洗缓冲液中, 然后加入 0.5mL 的蛋白酶 K ($0.4\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 溶于清洗缓冲液中配制), 50 水浴中消化 3h, 再在冰上骤冷 5min, 然后于 $12000g \cdot \text{min}^{-1}$ 、4 下离心 10min, 收集上清液即为 DPC 中的 DNA.

DPC 的定量: 先制作 DNA 浓度的标准曲线. 用清洗缓冲液配制终浓度为 0、100、300、500、750、1000、1500、2000、3000、5000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的小牛胸腺 DNA 标准液, 然后加入 1mL 新鲜配制的 $400\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 荧光染料 Hoechst33258, 使荧光染料的终浓度为 $200\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在暗处染色 30min, 用 F-4500 型荧光分光光度计在 350nm 激发光和 450nm 发射光下测得各浓度的荧光值, 制备标准曲线, 如图 1 所示, 回归方程为: $y = 2.4423 + 0.0028x$, $r^2 = 0.9974$. 将染色后样品用 F-4500 型荧光分光光度计测定其荧光值, 根据标准曲线来定量交联 DNA 和自由 DNA, 再计算 DPC 系数 η .

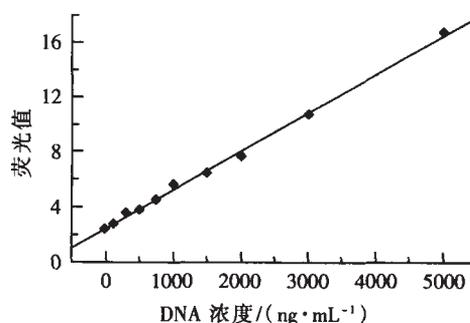


图 1 DNA 浓度的标准曲线

Fig.1 The standard curve of DNA concentration

1.4 试验数据的统计学分析

实验测得的各项数据用 Origin6.1 统计软件分析并进行 t 检验和绘图.

2 结果 (Results)

以前的研究结果证实, 甲醛可依剂量-效应关系诱导细胞 DPC 的形成, $125\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醛就可以显著性诱导 DPC 形成 (Liu et al., 2006), 因此, 本研究选用 $500\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醛染毒肝细胞, 结果见图 2. 当细胞悬浮在生理盐水中时, DPC 系数较低, 仅为 0.095 ± 0.0099 ($n=13$). 当悬浮液中加入 10% 的胎牛血清以后, 同样浓度甲醛引起的 DPC 系数极显著上升, 达到 0.173 ± 0.0138 ($p < 0.01$, $n = 13$). 加入 10% 分离血浆以后, DPC 上升更加明显, 达到 0.194 ± 0.0267 ($p < 0.01$, 由于取血有限, $n = 4$), 但血清组和血浆组 DPC 系数没有显著性差异 ($p > 0.05$). 结果提示, 血清和血浆对甲醛诱导 DPC 形成有促进作用, 而不是缓冲作用.

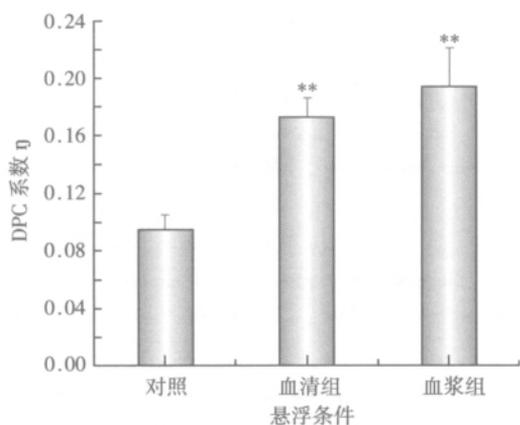


图 2 血清和血浆对小鼠 DPC 形成的促进作用 (**: $p < 0.01$, 与对照组比较)

Fig.2 Facilitative effect of fetal serum and plasma on DPC formation in mice liver cells (**: $p < 0.01$, compared with control group)

3 讨论 Discussion)

目前国际上关于甲醛远距离毒性 (site-distant toxicity) 还有很大的争议, 争论的实质是: 甲醛诱导白血病是否具有分子生物学的基础. 支持者认为, 尽管机体可以迅速代谢吸入的甲醛, 但甲醛仍然可以以某种方式在远距离组织积累和释放, 产生远距离毒性效应, 例如, 远离呼吸器官作用于骨髓, 诱导白血病 (Coggon et al., 2003; Hauptmann et al., 2003; Shaham et al., 1996; 2003). 反对者认为, 机体内酶系统对甲醛的解毒作用以及甲醛的高化学活性, 可以有效降低血液中自由甲醛的浓度, 因此甲醛只可能在高浓度下对暴露组织产生毒性效应, 不具有远距离毒性, 所以甲醛诱导白血病不具有分子生物学基础 (Collins et al., 2001; Heck et al., 2004; Franks, 2005). 因此, IARC 目前的结论是: 关于甲醛诱发白血病的调查数据充分, 但是理论依据不足, 需要通过进一步的研究以确认甲醛诱发白血病的机理 (IARC, 2004).

我们认为, 反对甲醛远距离毒性的学者忽视了另一种可能性, 即甲醛与体内分子反应生成的产物可能重新释放产生甲醛, 因为内源性甲醛是一种机体代谢的正常产物. 本试验证实, 血清和血浆对甲醛诱导 DPC 的形成不是抑制作用, 而是促进作用, 这提示, 机体内分子与甲醛的反应并不总是降低甲醛的毒性, 反而可能促进甲醛的某些毒性效应, 例如 DPC. 关于甲醛远距离毒性的机理如图 3: 吸入甲醛在暴露组织和血液中生产 FA-

X 的加合物, 并在血液中运输, 达到局部组织, 并在局部组织酶系作用下, 重新产生甲醛, 参与远距离毒性作用. 甲醛暴露后, 血液中自由甲醛虽然保持平衡, 但这种 FA-X 的加合物却可能上升, 并成为远距离毒性效应主要参与者.

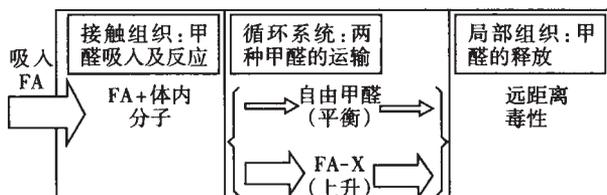


图 3 吸入甲醛远距离毒性效应的可能机制

Fig.3 Possible mechanism of the site-distant toxicity of inhaled formaldehyde

实际上, 化学性质活泼的化合物与远距离效应并不完全矛盾. 例如, 一氧化氮 (NO) 虽然化学性质活泼, 在机体内不能稳定存在, 但吸入 NO 仍然可以导致外周血管舒张作用, 也可能产生毒性效应, 其中, 舒张作用主要是通过形成亚硝基硫醇 (S-nitrosothiol, SNO) 实现的, 而毒性作用是通过形成其他氮化物 (NO₂、过氧亚硝酸盐等) 实现的 (Hogg, 2002; Weinberger et al., 2000). 与 NO 类似, 甲醛也是一种化学性质活泼, 可在机体内以其他形式存在的化合物. 因此, 有必要进一步研究甲醛吸入后血液中形成了哪种甲醛的加合物, 以及这种加合物是否参与了吸入甲醛的远距离效应的实现 (Thrasher, 2001).

通讯作者简介: 杨旭 (1954—), 男, 华中师范大学生命科学学院教授, 副院长. 从事室内空气污染与健康关系研究 22 年. E-mail: yangxu@mail.ccnu.edu.cn; Tel: 027-67867774.

References

- Agrawal S, Kumar A, Srivastava V, Mishra B N. 2003. Cloning, expression, activities and folding studies of serine hydroxymethyl-transferases: a target enzyme for cancer chemotreraapy [J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 6: 67- 75
- Binzak B A, Vockley J G, Jenkins R B, Vockley J. 2000. Structure and analysis of the human dimethylglycine dehydrogenase gene[J]. Molecular Genetics and Metabodism. 69 : 181- 187
- Chakrabarti S K, Bai C J, Subramanian K S. 1999. DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat renal cortical cells and its antagonism by specific amino acids and magnesium ion[J]. Toxicol Appl Pharm, 154: 245- 255

- Coggon D, Harris E C, Poole J, Palmer K T. 2003. Extended follow-up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde [J]. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1608-1615
- Collins J J, Ness R, Tyl R W, Krivanek N, Esmen N A, Hall T A. 2001. A review of adverse pregnancy outcomes and formaldehyde exposure in human and animal studies [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 34: 17-34
- Franks S J. 2005. A mathematical model for the absorption and metabolism of formaldehyde vapour by humans [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 206: 309-320
- Haberle D G, Hill W, Kazachkov M, Richardson J S, Yu P H. 2004. Protein cross-linkage induced by formaldehyde derived from semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination of methylamine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 310: 1125-1132
- Hauptmann M, Lubin J H, Stewart P A, Hayes R B, Blair A. 2003. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries [J]. *J Natl Cancer Inst*, 95: 1615-1623
- Heck H d 'A, Casanova M. 2004. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity [J]. *Regul Toxicol Pharmacol* 40: 92-106
- Hogg N. 2002. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 585-600
- International Agency for research on Cancer. 2004. IARC classifies formaldehyde as carcinogenic to humans [OL]. 2004-06-15, <http://www.iarc.fr/ENG/Press-Releases/archives/pr153a.html>
- Kuykendall J R, Trela B A, Bogdanffy M S. 1995. DNA-protein crosslink formation in rat nasal epithelial cells by hexamethylphosphoramide and its correlation with formaldehyde production [J]. *Mutat Res*, 343: 209-218
- Liu Y, Li C M, Lu Z, Ding S, Yang X, Mo J. 2006. Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks [J]. *Front Biosci*, 11: 991-997
- Reuber E B, Karl C, Reimann S A, Mihalik S J, Dodt G. 1997. Cloning and functional expression of a mammalian gene for a peroxisomal sacrosine oxidase [J]. *J Biol Chem*, 272: 6766-6776
- Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z. 2003. DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde [J]. *Occup Environ Med* 60: 403-409
- Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, Kaufman Z, Palma E, Ribak J. 1996. DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde-in vitro and in vivo studies [J]. *Carcinogenesis*, 17: 121-125
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone J R, Cole P A, Casero R A, Shi Y. 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 [J]. *Cell*, 119: 941-953
- Thrasher J D. 2001. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde [J]. *Arch Environ Health*, 56: 300-311
- Weinberger B, Laskin D L, Heck D E, Laskin J D. 2000. The toxicology of inhaled nitric oxide [J]. *Toxicol Sci*, 59: 5-16
- Zhitkovich A, Costa M. 1992. A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo [J]. *Carcinogenesis*, 13: 1485-1489

《生态毒理学报》论文附图格式要求

1. 论文插图用于描绘难以用文字或表格表达的内容。因此,应突出图的直观性和自明性,即不阅读正文,仅借助图例和图注就可以获得必要的信息。
2. 图的长宽比、坐标轴单位的设计、线条疏密程度等要科学、合理,切忌过分重叠、凌乱。要注意图的整体效果。
3. 图要大小合适(能够看清所反映的内容)。插图通常分为半栏图(图宽 45~65mm)和通栏图(图宽 100~120mm)。作者可根据文中图的需要、繁简程度确定合适的宽度。
4. 中英文图题置于图的下方;图注一般置于中英文图题之间,亦可放在图内;图例要清晰、分明、大小合适,一般应放在图中空当处。图例应采用易区分的标识,如 \times 、 \square 等。避免采用粗细线之别或灰度差之别;尽量不用虚线和点划线作图例。
5. 对于坐标图,标目一般由物理量及其相应的符号和单位组成。图中用符号表示数值的量和单位时,应按 GB3101-93 的规定,用量与单位的比值表示数值,即物理量符号(斜体)与单位(正体)之间用斜线隔开,如 p/Pa, c / (mol·L⁻¹) 等。
6. 为便于国际交流,除图题需中英文对照外,坐标标目及图中的注释、图例等亦应中英文对照。
7. 图字采用 6 号宋体(英文用 8P)。图中物理量符号、单位符号应与文稿一致。
8. 对于照相图,原稿照片应图像清晰,层次分明,反差适中,无污损和折痕。电子显微照片图还应在其说明文字或注释中表明其放大倍数。如用彩图请事先向编辑部说明,彩页另收费。
9. 凡属我国全国政区图,务请给出包括南海诸岛的全图;对地图国界的绘制要特别慎重。有关此类图编辑部需送有关主管单位审批才可刊发。